

公開特許・実用（抄録A）

特開平11-75826

【名称】 分解方法、容器および微生物

審査／評価者請求 未 請求項／発明の数 4 （公報 16頁、抄録 8頁）

公開日 平成11年(1999) 3月23日

出願／権利者 株式会社東芝（神奈川県川崎市幸区堀川町72番地）
 発明／考案者 池田 理夫 （他2名）※
 出願番号 特願平9-235099 平成9年(1997) 8月29日
 代理人 須山 佐一

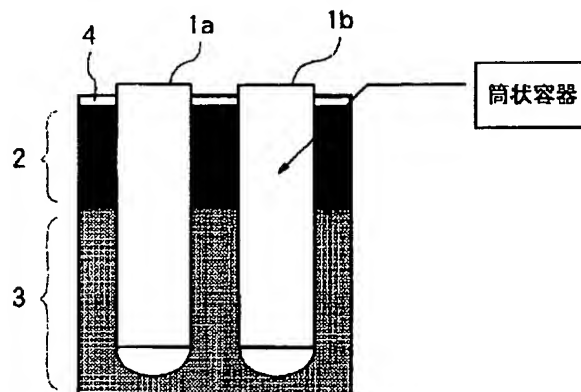
Int. Cl. 6 識別記号
 C12N 1/20 ZAB
 C02F 3/00 ZAB
 3/06
 3/10
 3/34
 //(C12N 1/20
 C12R 1:38)
 FI ※
 ※最終頁に続く

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物を用いた分解方法、多孔質体を筐体に備えた容器および新規微生物に関する。

(57) 【要約】

【課題】 有機化合物を含有する場に微生物を誘引し、誘引した微生物により経済的かつ効果的に有機化合物を分解できる分解方法、有機化合物を含有する場に微生物を配置し、該配置した微生物により経済的かつ効果的に有機化合物を分解できる分解方法、地下水や土壌等の環境中より有機化合物を効果的に回収でき、内部に微生物を収納することにより、有機化合物と微生物との接触に係る効率を向上させ、微生物により経済的かつ効果的に有機化合物を分解させることができる容器および経済的かつ効果的に有機化合物を分解できる新規な微生物を提供すること。

【解決手段】 有機化合物を含有した場に微生物を配置し、有機化合物に対する分解能を備えた微生物、例えば、YMC T-003株を用いて環境中の有機化合物を効率的に生物分解する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 陸水と接しかつ有機化合物を含有した場に、前記陸水の流れに逆らって微生物が誘引されるよう、前記微生物を誘引する誘引物質の濃度勾配を形成する工程と、

前記濃度勾配に基づいて誘引された前記微生物に前記有機化合物を分解させる工程と、

を具備したことを特徴とする分解方法。

【請求項2】 陸水より比重の大きな担体に微生物を担持する工程と、

前記微生物を担持した担体を、前記陸水と接しかつ有機化合物を含有した場に配置する工程と、

前記配置した担体に担持された微生物に前記有機化合物を分解させる工程と、

を具備したことを特徴とする分解方法。

【請求項3】 多孔質体を有した筐体を具備し、

前記多孔質体は疎水性を示すことを特徴とする容器。

【請求項4】 シュードモナス・セパシア（*Pseudomonas cepacia*）FERM BP-6085菌株。

【発明の実施の形態】 以下、本発明を実施するための形態について説明する。

はじめに、本発明の微生物について述べる。

まず、高濃度のTCEで汚染された関東ローム層より土壌を採取し、土壌より抽出した抽出液を、無機寒天培地上に接種、あるいは、0.1Mリン酸ナトリウムバッファ0.1mLおよびトップアガー0.5mLに加え、密閉可能な容器内に作製した無機塩寒天培地上に重層した。なお、抽出液は、滅菌したバイアル瓶に土壌1gと蒸留水9gとを導入して混合し、超音波処理あるいは十分振盪した後、得られた水溶液である。トップアガー重層時には、トップアガーを固化した後、TCE-アセトニトリル溶液を添加して密閉し、298Kに設定した恒温槽内で5～10日間程度培養した。この際、TCEは、密閉容器内の気相中の濃度として50～10000ppmとなるように加えた。この後、無機寒天培地上、あるいは、トップアガーに出現したコロニーを白金耳で分離して有機化合物耐性菌を得た。次に、得られた有機化合物耐性菌の中から、有機化合物に対する分解能を有する微生物を以下のようにして選択した。まず、分離した耐性菌をそれぞれLB液体培地に

接種し、例えば298K、100rpmで1晩振盪培養して菌の前培養を行い、菌懸濁液をそれぞれ得た。次いで、バイアルビンに菌懸濁液 100 μ L 分の菌体 (OD 660=1.0) と無機塩培地25mLとを入れ、TCEを1ppmになるように加える。バイアルビンをテフロンコートされたブチルゴムキャップとアルミキャップシールで密封して、298K、100rpmで振盪培養し、TCEの分解を観察することによって、有機化合物に対する分解能を有する耐性菌を選択した。こうして、本発明の微生物であるYMCT-003株(工業技術院生命工学工業技術研究所に「FERMBP-6085」として寄託)が単離された。

YMCT-003株の細菌学的性質は、以下に示す通りである。

(a) 形態的性質等

- | | |
|----------------|-----------|
| (1) 細胞の形および大きさ | : 桿菌 |
| (2) 多形性の有無 | : 多形性を認めず |
| (3) 運動性 | : 運動性を認める |

(b) 培養的性質

- | | |
|--------------|-----------------------|
| (1) 肉汁寒天平板培養 | : 集落は培養6時間後では円形、その後、寒 |
| | 天平板上に拡散する |

(c) 生理学的性質

- | | |
|--------------|-----|
| (1) グラム染色性 | : - |
| (2) 硝酸塩の還元 | : + |
| (3) インドールの生成 | : - |
| (4) 色素の生成 | : - |
| (5) ウレアーゼ | : - |
| (6) オキシダーゼ | : - |
| (7)カタラーゼ | : + |
| (8) 炭素源の利用 | |

- | | |
|-------------------|-----|
| L-アラビノース | : + |
| D-グルコース | : + |
| D-マンノース | : + |
| D-マンニトール | : + |
| N-アセチルグルー | |
| D-グルコサミン | : + |
| マルトース | : + |
| グルコン酸カリウム | : + |
| n-カプリン酸 | : - |
| アジピン酸 | : + |
| d1-リンゴ酸 | : + |
| クエン酸ナトリウム | : + |
| 酢酸フェニル | : + |
| アルギニンジヒドラーゼ | : - |
| β -ガラクトシダーゼ | : + |

- | | |
|-----------|-----|
| (9) 色素の生成 | : - |
|-----------|-----|

- | | |
|------------|--|
| (10) 生育の範囲 | |
|------------|--|

- | | |
|----|-------------------------|
| pH | : 6.0~9.5 (6.5~8.5 で良好) |
| 温度 | : 4~40℃ (25~40℃で良好) |

- | | |
|---------------|-------|
| (11) 酸素に対する態度 | : 好気性 |
|---------------|-------|

- | | |
|--------------------|--|
| (12) 糖からの酸の生成 (発酵) | |
|--------------------|--|

- | | |
|---------|-----|
| D-キシロース | : - |
| D-グルコース | : + |
| リボース | : + |
| マルトース | : + |
| シュクロース | : + |

ラクトース : -

D-マンニトール : +

グリコーゲン : -

(d) 他の生理学的性質

- | | |
|--------------|-----|
| (1) エスクリンの分解 | : + |
|--------------|-----|

- | | |
|-------------|-----|
| (2) ゼラチンの液化 | : + |
|-------------|-----|

上述した細菌学的性質をもとに、「バージェイズ マニュアル オブ システマティック バクテリオロジー ボリューム2, 1986(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, 1986)」および「バージェイズ マニュアルオブ デターミナティブ バクテリオロジー 1994(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994)」にしたがって検索を行ったところ、YMCT-003株は、シュードモナス・セパシアに属する株であるとの結論に達した。YMCT-003株の培養に関し、YMCT-003株は277Kから318Kまでの温度範囲で生育可能ではあるが、培養温度は 298~313Kとすることが好ましく、最も適する培養温度は 303~313Kである。また、培地のpHは 6.0~9.5、さらに pH6.5~8.5とすると好ましく、最も培養に適する培地のpHは 7.5~8.0である。培地としては、一般細菌用のLB培地、NB培地等、および各種無機塩培地を用いて生育可能である。YMCT-003株は、TCE、cis-DC E、trans-DC E、1,1-DC E等を唯一の炭素源として生育可能であり、かつテトラクロロエチレン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、テトラクロロエタン、塩化ビニル、四塩化炭素、フッ化ビニル、3,3,3-トリフルオロ-2-プロペン、2,3-ジクロロヘキサフルオロ-2-ブテン、臭化ビニル、トルエン、フェノール、クレゾール、ジクロロベンゼン、トリクロロベンゼン、1-プロモナフタレン、プロモベンゼンおよびポリ塩化ビフェニル類等の種々の有機化合物に対して分解能を示す。従って、有機化合物に汚染された環境の微生物による浄化・分解処理等において、有効かつ幅広く利用することができ、実用性に優れるものである。また、YMCT-003株をバイオリアクタに適用し、菌数を調整することによって、より高濃度の有機化合物を効率よく分解することができる。なお、YMCT-003株は、pH6.0~8.5 および 283~303Kの温度範囲で有機化合物を良好に分解するので、YMCT-003株をバイオリアクタに適用した場合には、バイオリアクタ内の菌床のpHを6.5~8.5とし、かつ温度を 298~313Kの範囲に制御することが望ましい。

次に、本発明の実施例について説明する。

(実施例1および比較例1) 図1に示すように、1m \times 1m \times 5mのコンクリート製ライシメータに、TCEの濃度を1ppmとした土壌を充填し、平均孔径0.1 μ mのフッ素樹脂からなる多孔質体により筒状に成型した容器1aおよび1bを埋設した。ライシメータに詰めた土壌には、環境中の土壌と同様に、不飽和帯2および飽和帯3とが構成されており、地下水位が3mになるようにTCEを1ppmを含む純水が添加されている。次に、容器1aおよび1bが露出するように、土壌の表面を塩化ビニル製の板4で覆いエポキシ樹脂により密閉した。

次に、ライシメータより、地下水および土壌を定期的にサンプリングし、地下水および土壌に含まれるTCEの濃度を測定した。なお、TCEの濃度の測定は、地下水については、地下水の50mLをバイアルビンに添加しテフロンコートしたブチルゴムセブタムで栓をした後、アルミキャップにより密封し、1時間程度振盪撹拌した

後にヘッドスペース/GC法により測定した。また、土壌については、土壌5gをバイアルビンに添加し、全体が50mlになるように純水を添加して地下水と同様に密封後1時間程度振盪攪拌し、ヘッドスペース/GC法により測定した(実施例1)。

一方、透水性の濾紙により、容器1aおよび1bと全く同一の形状の容器を使用した以外は、実施例1と同様にして、地下水および土壌に含まれるTCEの濃度を測定した(比較例1)。その結果を図2に示す。

図2から明らかなように、実施例1においては、透水性の濾紙を筐体とした比較例1の容器と比較して、地下水および土壌に含まれるTCEを効果的に回収することができた。

(実施例2および実施例3) 容器1aおよび1bの内部に活性炭を充填した以外は、実施例1と同様にして、地下水および土壌に含まれるTCEの濃度を測定した(実施例2)。また、容器1aおよび1bの内部に高吸油性樹脂を充填した以外は、実施例1と同様にして、地下水および土壌に含まれるTCEの濃度を測定した(実施例3)その結果を図3に示す。

図3から明らかなように、実施例2および実施例3においては、地下水および土壌に含まれるTCEを効果的に回収することができるが、特に、容器1aおよび1bの内部に高吸油性樹脂を充填した場合には、該高吸油性樹脂へのTCEの吸収が促進されるので、ほぼ全ての地下水および土壌に含まれるTCEを回収することができた。

(実施例4) 図4に示すように、1m×1m×5mのコンクリート製ライシメータに、TCEの濃度を1ppmとした土壌を充填し、平均孔径0.1μmのフッ素樹脂からなる多孔質体により筒状に成型した容器1aおよび1bを埋設した。なお、容器1aおよび1bには、その内部に外気を導入する導入管4aおよび4bと、内部より外気を排出する排出管5aおよび5bとを備えた蓋6aおよび6bが取り付けられており、容器1aおよび1bへの外気の導入は、導入管4aおよび4bと接続したプロア7aおよび7bを駆動することにより実施された。また、容器1aおよび1bに対しては、外気が3L/分の流量で導入されており、プロア7aおよび7bは、太陽電池8aおよび8bにより駆動されるように構成されている。さらに、ライシメータに詰められた土壌には、実施例1と同様に、不飽和帯2および飽和帯3とが構成されており、地下水位が3mになるようにTCEを1ppmを含む純水が添加されている。次に、容器1aおよび1bが露出するように、土壌の表面を塩化ビニル製の板4で覆いエポキシ樹脂により密閉した。

次いで、ライシメータより、地下水および土壌を定期的にサンプリングし、地下水および土壌に含まれるTCEの濃度を測定した。なお、TCEの濃度の測定は、地下水については、地下水の50mlをバイアルビンに添加しテフロンコートしたブチルゴムセプタムで栓をした後、アルミキャップにより密封し、1時間程度振盪攪拌した後にヘッドスペース/GC法により測定した。また、土壌については、土壌5gをバイアルビンに添加し、全体が50mlになるように純水を添加して地下水と同様に密封後1時間程度振盪攪拌し、ヘッドスペース/GC法により測定した。さらに、排出管5aおよび5bより排出される排気については、捕集袋に排気を添加し、GC法により測定した。その結果を図5に示す。

図5(a)から明らかなように、容器1aおよび1bに外気を導入することにより、地下水および土壌に含

まれるTCEをより効果的に回収することができた。また、図5(b)から明らかなように、地下水および土壌に含まれるTCEの回収と同期するように、排出管5aおよび5bより排出される排気中よりTCEが検出されたことから、外気の導入が、地下水および土壌に含まれるTCEの回収に効果的な役割を果たしていることが確認された。

(実施例5) 容器1aおよび1bに有機塩素化合物に対する分解能を有する上記YMC T-001株を担持した多孔質セラミックスを充填した以外は、実施例4と全く同様にして地下水および土壌に含まれるTCEの濃度を測定した。その結果を図6に示す。

図6(a)および図6(b)から明らかなように、容器1aおよび1b内に有機塩素化合物に対する分解能を有する微生物を担持した担体を充填することにより、土壌および地下水から容器1aおよび1b内にTCEを効率よく回収するとともに、容器1aおよび1b内に移動したTCEを効率よく分解することができた。

(実施例6および比較例2) 図7に示すように、1m×1m×35mのコンクリート製ライシメータに、TCEの濃度を1ppmとした土壌を充填し、平均孔径0.1μmのフッ素樹脂からなる多孔質体により筒状に成型した容器1aおよび1bを深度30~35mに埋設した。なお、容器1aおよび1bには、その内部に外気を導入する導入管4aおよび4bと、内部より外気を排出する排出管5aおよび5bとを備えた蓋6aおよび6bが取り付けられており、容器1aおよび1bへの外気の導入は、導入管4aおよび4bと接続したプロア7aおよび7bを駆動することにより実施された。また、導入管4aおよび4bには逆止弁9aおよび9b、排出管5aおよび5bには圧力調整弁10aおよび10bが設けられており、容器1aおよび1b内の圧力が常に地下水位とほぼ同程度に保たれるように調整した。したがって、プロア7aおよび7bから容器1aおよび1bに流入した気体は、地下水位を越えた場合にのみ地上へと排出され、またプロア7aおよび7bの停止時に地下水が容器1aおよび1b内に進入しないように構成されている。容器1aおよび1bに対しては、外気が3L/分の流量で導入されており、プロア7aおよび7bは、太陽電池8aおよび8bにより駆動されるように構成されている。さらに、ライシメータに詰められた土壌には、不飽和帯2および飽和帯3とが構成されており、地下水位が30mになるようにTCEを1ppmを含む純水が添加されている。次に、容器1aおよび1bが露出するように、土壌の表面を塩化ビニル製の板4で覆いエポキシ樹脂により密閉した。

次いで、ライシメータより、地下水を定期的にサンプリングし、地下水および排気に含まれるTCEの濃度を測定した(実施例6)。なお、TCEの濃度の測定は、実施例4と全く同様である。その結果を図8に示す。

図8(a)から明らかなように、容器1aおよび1bに外気を導入することにより、深度の深い位置においても地下水に含まれるTCEをより効果的に回収することができた。また、図5(b)から明らかなように、地下水に含まれるTCEの回収と同期して、排出管5aおよび5bより排出される排気中よりTCEが検出されたことから、容器1aおよび1bの内部の圧力が適正に保たれているとともに、外気の導入が、地下水に含まれるTCEの回収に効果的な役割を果たしていることが確認された。

一方、透水性の濾紙により、容器1aおよび1bと全く同一の形状の容器を使用した以外は、実施例6と同

様の構成にして試験を行った。(比較例 2)。

その結果、容器 1 a および 1 b に地下水が侵入し、地下水に対する曝気処理を行っている状況と同様の形態となった。したがって、プロア 7 a および 7 b から容器 1 a および 1 b を通過し、排出管 5 a および 5 b を経て地上へ排出されるという気体の流れは形成できず、地下水に含まれる TCE を回収することはできなかった。

(実施例 7) 容器 1 a および 1 b に有機塩素化合物に対する分解能を有する上記 YMCT-001 株を担持した多孔質セラミックスを充填した以外は、実施例 6 と全く同様にして地下水および排気に含まれる TCE の濃度を測定した。その結果を図 9 に示す。

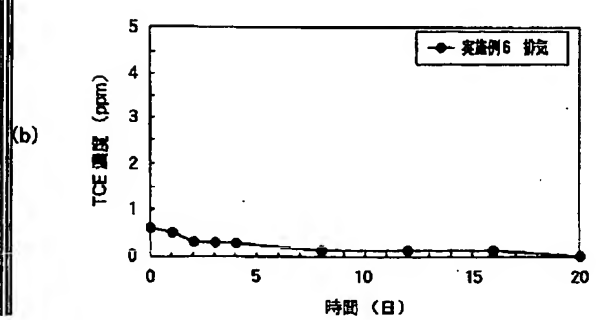
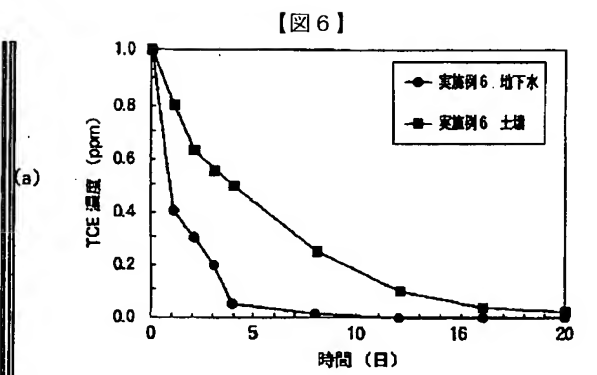
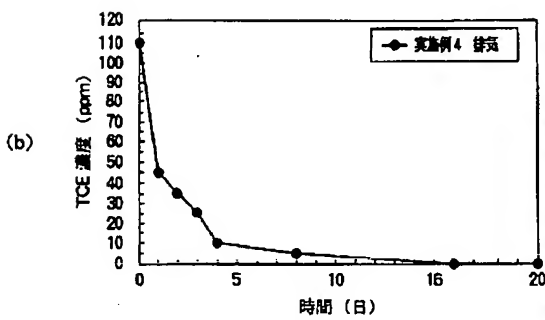
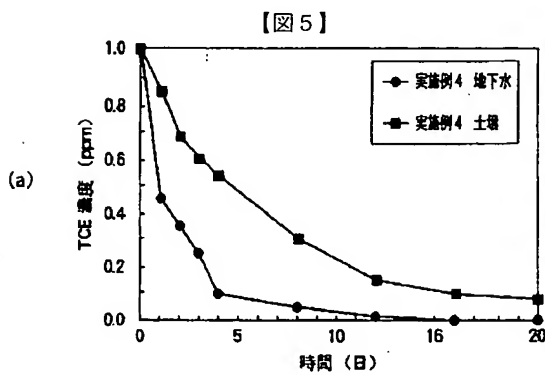
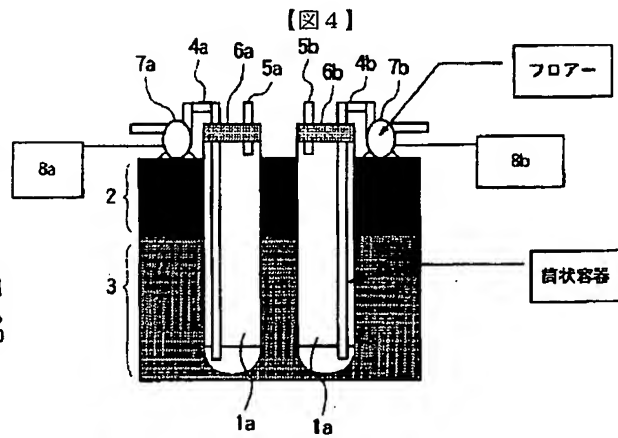
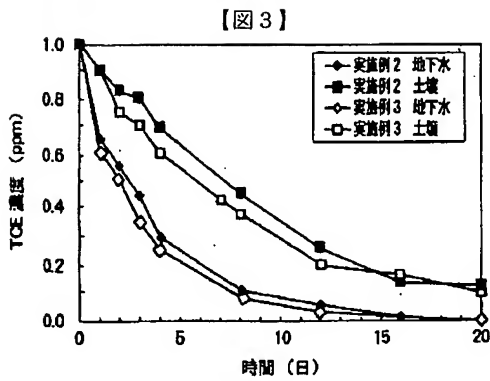
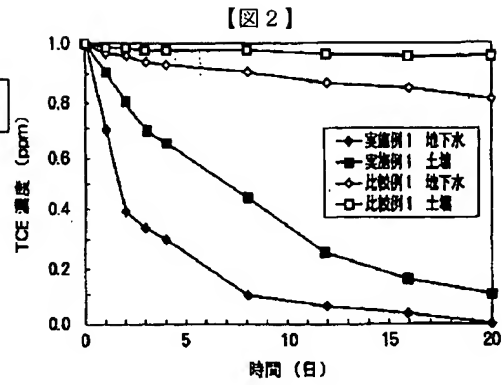
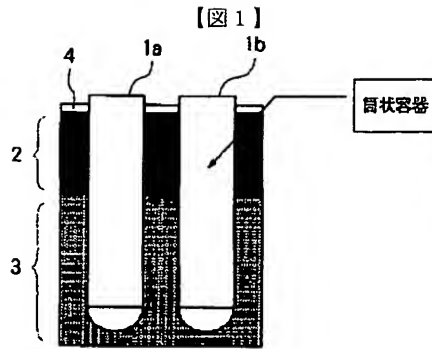
図 9 (a) および図 9 (b) から明らかなように、容器 1 a および 1 b 内に有機塩素化合物に対する分解能を有する微生物を担持した担体を充填することにより、土壌および地下水から容器 1 a および 1 b 内に TCE を効率よく回収するとともに、容器 1 a および 1 b 内に移動した TCE を効率よく分解することができた。

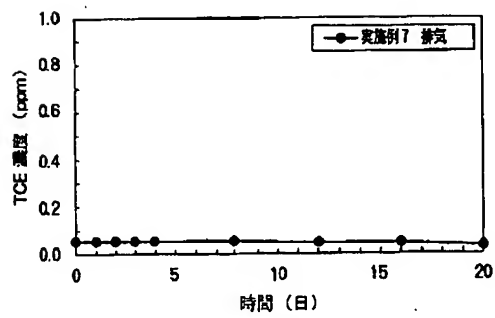
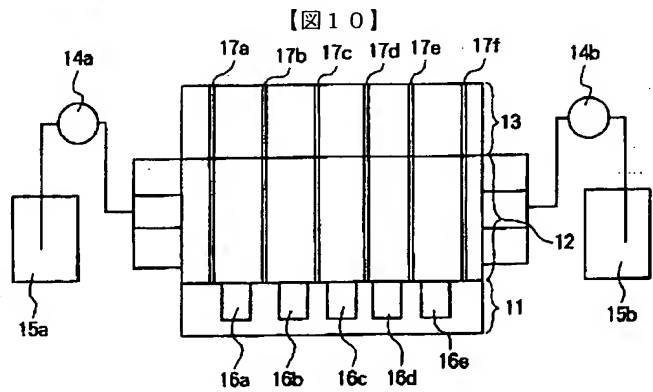
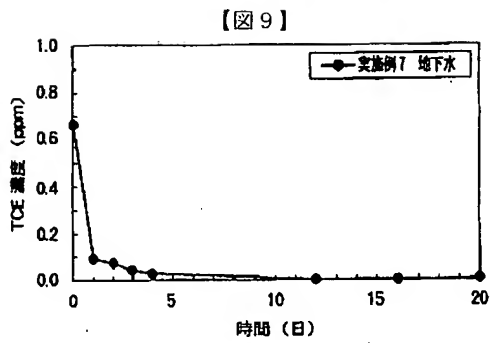
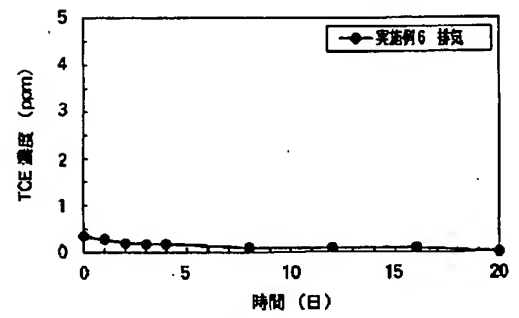
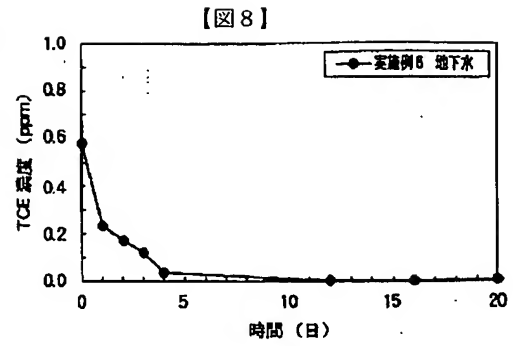
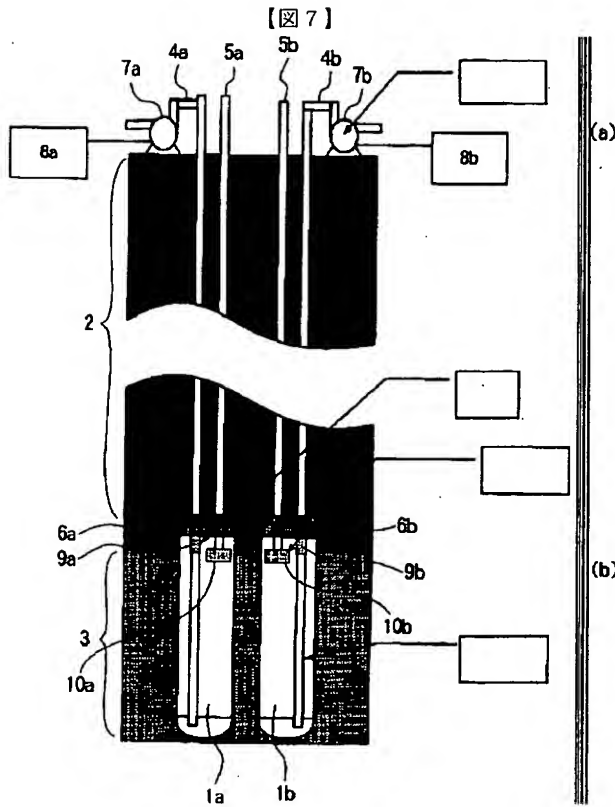
(実施例 8、比較例 3 および比較例 4) 図 10 に示すように、5m×5m×10m のライシメータに、最下部からシルト粘土層 11、砂礫層 12 および黒ボク土層 13 を充填した。また、地下 4m 以下を水で飽和させ、ポンプ 14 a およびポンプ 14 b を用いて、タンク 15 a からタンク 15 b に向かうよう、砂礫層の部分で 0.3m/日の流速を設定して模擬地下水流を発生するように構成した。なお、シルト粘土層 11 には、ライシメータの出口における模擬地下水中の cis-DCE の濃度が約 1ppm 程度となるように、予め cis-DCE の蒸気を添加した。

次に、シルト粘土層 11 に、砂礫層 12 の下部と接するよう、LB 培地を寒天で固化して SUS 管に充填した誘引物質 16 a ~ 16 e を一定間隔で埋設した。なお、SUS 管には多くの穴を開けておき、LB 培地が徐々に地下水中に拡散できるように構成した。次いで、誘引物質 16 a ~ 16 e の周辺に、有機塩素化合物に対する分解能を有する上記 YMCT-003 株を、注入管 17 a ~ 17 f を通じて高圧注入した。そして、YMCT-003 株の注入後、ライシメータの出口で模擬地下水を定期的にサンプリングし、ヘッドスペース/GC 法により模擬地下水中の cis-DCE 濃度を測定した。また、YMCT-003 株を注入して 50 日後に、誘引物質 16 a ~ 16 e を埋設した周辺の砂礫層 12 の最下部より土壌をサンプリングし、平板希釈法により YMCT-003 株の濃度を測定した(実施例 8)。一方、YMCT-003 株を注入しない以外は実施例 1 と同様にして模擬地下水中の cis-DCE 濃度を測定した(比較例 3)。また、LB 培地の代わりに無機塩培地を寒天で固化して SUS 管に充填したものを誘引物質として埋設した以外は実施例 1 と同様にして模擬地下水中の cis-DCE 濃度および YMCT-003 株の濃度を測定した(比較例 4)。その結果を、図 11 および表 1 に示す。

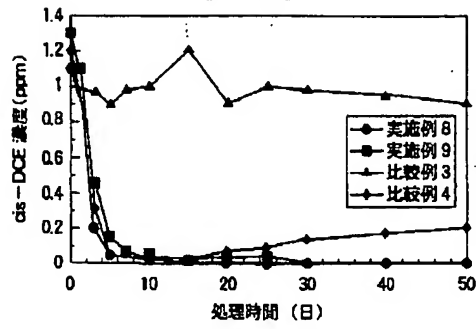
【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 実施例 1 に係る構成を示す図である。
 - 【図 2】 実施例 1 および比較例 1 の結果を示す図である。
 - 【図 3】 実施例 2 および実施例 3 の結果を示す図である。
 - 【図 4】 実施例 4 に係る構成を示す図である。
 - 【図 5】 実施例 4 の結果を示す図である。
 - 【図 6】 実施例 5 の結果を示す図である。
 - 【図 7】 実施例 6 および比較例 2 に係る構成を示す図である。
 - 【図 8】 実施例 6 の結果を示す図である。
 - 【図 9】 実施例 7 の結果を示す図である。
 - 【図 10】 実施例 8、比較例 3 および比較例 4 に係る構成を示す図である。
 - 【図 11】 実施例 8、実施例 9、比較例 3 および比較例 4 の結果を示す図である。
 - 【図 12】 実施例 10 の結果を示す図である。
 - 【図 13】 実施例 12 および比較例 5 に係る構成を示す図である。
 - 【図 14】 実施例 12 の結果を示す図である。
 - 【図 15】 比較例 5 の結果を示す図である。
- 【符号の説明】
- 1 a、1 b……容器
 - 2……不飽和帯 3……飽和帯
 - 4 a、4 b……導尿管 5 a、5 b……排出管
 - 6 a、6 b……蓋 7 a、7 b……プロア
 - 8 a、8 b……太陽電池 9 a、9 b……逆止弁
 - 10 a、10 b……圧力調整弁 11……シルト粘土層、
 - 12……砂礫層 13……黒ボク土層
 - 14 a、14 b……ポンプ 15 a、15 b……タンク
 - 16 a ~ 16 e……誘引物質 17 a ~ 17 f……注入管
 - 18……領域 19 a、19 b……井戸

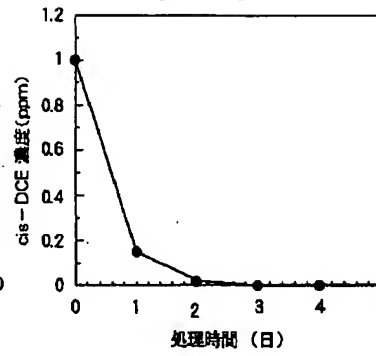




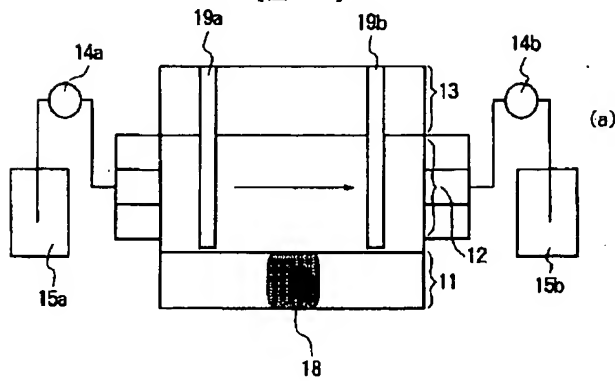
【図 11】



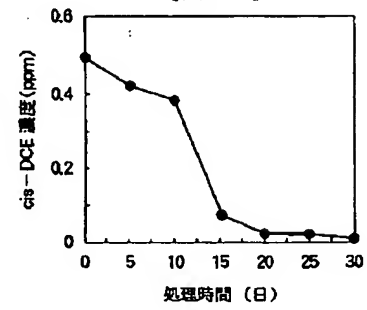
【図 12】



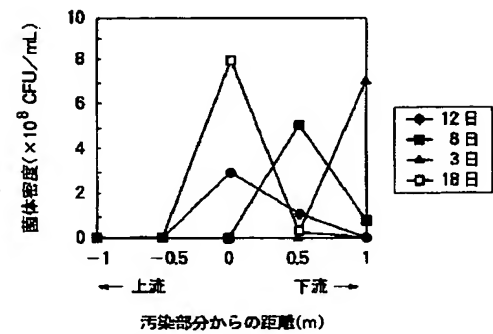
【図 13】



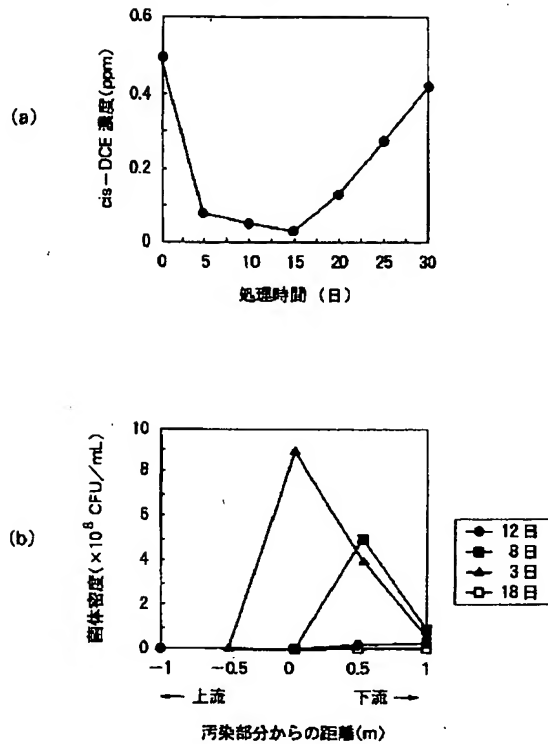
【図 14】



(b)



【図 1 5】



【書誌的事項の続き】

【IPC 6】 C12N 1/20;;ZAB;C02F 3/00 ZAB;3/06;3/10;3/34;/(C12N 1/20;C12R 1:38)

【FI】 C12N 1/20;;ZAB;C02F 3/00 ZAB;3/06;3/10;3/34

【識別番号または出願人コード】 000003078

【出願／権利者名】 株式会社東芝
神奈川県川崎市幸区堀川町 7 2 番地

【発明／考案者名】 池田 理夫
神奈川県川崎市幸区小向東芝町 1 番地 株式会社東芝研究開発センター内

【発明／考案者名】 今村 裕子
神奈川県川崎市幸区小向東芝町 1 番地 株式会社東芝研究開発センター内

【発明／考案者名】 石森 義雄
神奈川県川崎市幸区小向東芝町 1 番地 株式会社東芝研究開発センター内

【代理人】 須山 佐一

【出願形態】 OL

注) 本抄録の書誌的事項は初期登録時のデータで作成されています。